

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年10 月28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092732 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/553 県さいたま市北区東大成町2丁目600-7 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005515
- (22) 国際出願日: 2004 年4 月16 日 (16.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-111994 2003 年4 月16 日 (16.04.2003) JP
特願 2003-360986
2003 年10 月21 日 (21.10.2003) JP
特願2004-054295 2004 年2 月27 日 (27.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡 孝之 (OKA, Takayuki) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 大本 泉 (OMOTO, Izumi) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 川口 春馬 (KAWAGUCHI, Haruma) [JP/JP]; 〒2410814 神奈川県横浜市旭区中沢3丁目22-8 Kanagawa (JP). 涌井 渉 (WAKUI, Wataru) [JP/JP]; 〒3310814 埼玉
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PARTICLE HAVING MAGNETIC MATERIAL INCORPORATED THEREIN, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, PARTICLE FOR IMMUNOASSAY AND METHOD OF IMMUNOASSAY

(54) 発明の名称: 磁性体内包粒子及びその製造方法、免疫測定用粒子、並びに、免疫測定法

(57) Abstract: Particles having a magnetic material incorporated therein that exhibit uniform magnetism, excelling in dispersion stability and have a narrow particle diameter distribution; a process for producing the same; particles for immunoassay comprising the above particles; and a method of immunoassay in which use is made of the particles having a magnetic material incorporated therein or particles for immunoassay. In particular, particles having a magnetic material incorporated therein which comprise an organic polymeric material and a magnetic material of 1 to 30 nm average particle diameter, the magnetic material incorporated in dispersed form in the particles.

(57) 要約: 本発明の目的は、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びその製造方法、それを用いてなる免疫測定用粒子、並びに、それら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法を提供することである。本発明は、有機高分子物質と平均粒径1~30nmの磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、上記磁性体は、分散した状態で粒子内部に包含されている磁性体内包粒子である。



WO 2004/092732 A1

明細書

磁性体内包粒子及びその製造方法、免疫測定用粒子、並びに、免疫測定法

技術分野

- 5 本発明は、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びその製造方法、それを用いてなる免疫測定用粒子、並びに、それら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法に関する。

背景技術

- 10 従来、磁性体含有高分子粒子の作製法として（１）作製済みの高分子粒子に鉄イオンを含ませて磁性体を作製する方法、（２）モノマーから高分子粒子を重合する過程で作製済みの磁性体粒子を含ませる方法（特開平９－２０８７８８号公報参照）、（３）別々に作製した高分子粒子と磁性体粒子とを複合化させる方法（特開平６－２３１９５７号公報参照）が知られている。また、この他、（４）
15 磁性体粒子を高分子等で被覆する方法（特開平６－９２６４０号公報参照）がある。

- （１）の方法は鉄イオンを高分子粒子に吸収させるため、表面に磁性体が露出し、磁性体が酸化するという課題があった。また（２）の方法は磁性体粒子が均一に高分子粒子に取り込まれないという課題や、粒径の制御が困難で粒径分布の
20 広い物となるという課題があった。また、（３）の方法は高分子粒子が凝集するため、粒径の小さな粒子には使用できないという課題がある。また、（４）の方法は、被覆が均一にできないため、浮遊性や分散性が悪く、また、磁性体粒子表面の一部が露出する場合があった。

- 一方、微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、
25 蛍光イムノアッセイ等が従来から知られており、既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質等を標識として付加した抗原又は抗体を用い、これと特異的に反応する抗体又は抗原の有無を検出する方法である。このような免疫測定法に際して、磁性体内包粒子は、効率よくかつ簡便に
B／F分離を行うために用いられている。また、B／F分離以外の使用（特開２

000-88852号公報参照)や、磁性体内包粒子自体を標識材料とする免疫測定法(特開平6-148189号公報、特開平7-225233号公報、特表2001-524675号公報参照)が開示されている。

磁性体内包粒子自体を標識とする免疫測定法において、その測定精度は磁性体内包粒子の均質性、すなわち、粒子毎の磁性体含有量の均一性に依存する。しかしながら、市販されている磁性体内包粒子は、磁性体含有量にバラツキがあり、従来公知の磁性体内包粒子の製造法では、磁性体含有量の均一性を制御することは困難である。

磁性体内包粒子を免疫測定法に使用する際、抗原や抗体を結合させる工程や被検出物質と混合する工程において、磁性体内包粒子を緩衝液等に分散した分散液として取り扱う場合が生じる。このため、磁性体内包粒子には、分散液の状態で粒子が自然沈降しないような分散安定性の高いものであることが望ましい。しかしながら、市販されている磁性体内包粒子は、分散液の状態で、しばらく放置するとその一部が沈降する等という取り扱い性についての問題がある。

15

発明の要約

本発明は、上記課題に鑑み、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びその製造方法、それを用いてなる免疫測定用粒子、並びに、それら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法を提供することを目的とする。

20

本発明は、有機高分子物質と平均粒径1~30nmの磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、上記磁性体は、分散した状態で粒子内部に包含されている磁性体内包粒子である。

本発明の磁性体内包粒子において、有機高分子物質を構成する炭素元素と磁性体を構成する金属元素との構成比率の絶対偏差が0.3以下であることが好ましい。

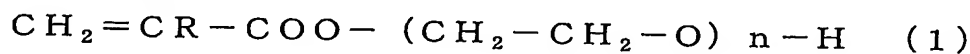
25

本発明の磁性体内包粒子において、磁性体は磁性体内包粒子を形成する重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成されたものであることが好ましい。また、上記金属イオンは、鉄イオンであることが好ましい。

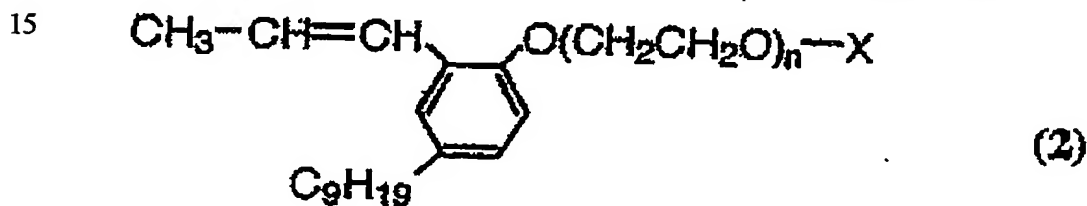
本発明の磁性体内包粒子において、上記有機高分子物質はアクリル系モノマーからなる重合体を主構成成分とすることが好ましく、上記アクリル系モノマーは、グリシジル基を有するモノマーであることが好ましい。

また、上記有機高分子物質は、グリシジル基を有するモノマーとスチレン系モノマーとからなる重合体を主構成成分とすることも好ましい。その場合、上記有機高分子物質中のスチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率は5～90重量%であることが好ましい。

更に、上記有機高分子物質は、下記一般式(1)で表されるポリエチレングリコール(メタ)アクリレート又は下記一般式(2)で表される化合物を重合体のモノマー成分として有することも好ましい。特に、グリシジル基を有するモノマー、又は、グリシジル基を有するモノマー及びスチレン系モノマーに、共重成分として添加されるのが好ましい。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは1～20の整数を表す。



式中、XはH又はSO₃⁻NH₄⁺を表し、nは3～30の整数を表す。

本発明の磁性体内包粒子において、上記有機高分子物質は架橋されていることが好ましい。

本発明の磁性体内包粒子は、粒子表面に、カルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基よりなる群より選ばれる少なくとも1種の官能基を有することが好ましい。

本発明の磁性体内包粒子は、平均粒径が0.05～1μmであることが好ましい。

本発明の磁性体内包粒子において、磁性体の含有量は0.1～50重量%であることが好ましい。

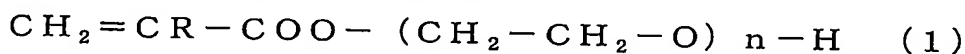
本発明の磁性体内包粒子が含有する磁性体の平均粒径は1～10nmであるこ

とが好ましい。

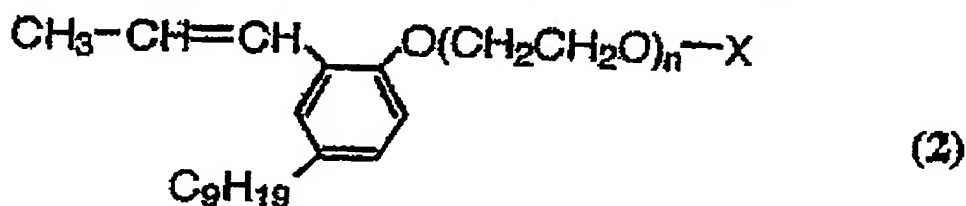
本発明の磁性体内包粒子は、粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合していることが好ましい。上記官能基は、エポキシ基であることが好ましく、上記リンカーは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルであることが好ましい。

本発明の磁性体内包粒子は、水系溶媒中において親水基を有さないモノマー及び／又は親水基を有するモノマーを重合して粒子を形成する工程と、上記粒子中に金属イオンを取り込みながら上記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、上記粒子を形成する工程と上記磁性体を形成する工程とを同時に進行させる方法により製造することができる。

上記親水基を有さないモノマーは、グリシジル基を有するアクリル系モノマー、又は、グリシジル基を有するアクリル毛位モノマー及びスチレン系モノマーであることが好ましい。また、親水基を有さないモノマー及び親水基を有するモノマーを重合して粒子を形成するのも好ましく、親水基を有するモノマーは、下記一般式(1)で表されるポリエチレングリコール(メタ)アクリレート又は下記一般式(2)で表される化合物であることが好ましい。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは1～20の整数を表す。



式中、XはH又はSO₃⁻NH₄⁺を表し、nは3～30の整数を表す。

また、上記粒子を形成する工程においては、共重合モノマーとして反応性乳化剤を添加してもよい。また、重合開始剤を後添加することが好ましい。

本発明の磁性体内包粒子に、抗原又は抗体が吸着又は結合してなる免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

また、本発明の磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法もまた、本発明の1つである。

更に、本発明の磁性体内包粒子を標識として用いる免疫測定法もまた、本発明の1つである。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、実施例2で得られた磁性体内包粒子（平均粒径；磁性体内包粒子0.21 μm 、磁性体5 nm）のTEM写真である。

発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

- 10 本発明の磁性体内包粒子は、有機高分子物質と平均粒径1～30 nmの磁性体とからなるものである。

上記有機高分子物質は、粒子のコアを形成するための親水基を有さないモノマーと、水中で安定に分散する粒子を形成しつつ粒子のシェルを形成するための親水基を有するモノマーとからなる重合体を主構成成分とするものである。

- 15 <親水基を有さないモノマー>

- 上記親水基を有さないモノマーとしては、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、p-クロロスチレン、クロロメチルスチレンなどのスチレン系モノマー；塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニルなどのビニルエステル類；アクリロニトリルなどの不飽和ニトリル類；メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ステアシル（メタ）アクリレート、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレートなどのアクリル系モノマー等が挙げられる。これら親水基を有さないモノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。
- 20
- 25

上記親水基を有さないモノマーとしては、好ましくは、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ステアシル（メタ）アクリレート、エチレン

グリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレートなどのアクリル系モノマーが用いられる。

- 5 上記親水基を有さないモノマーとしては、より好ましくは、重合による粒子形成と磁性体形成とを同時進行するため、粒子重合中に高濃度に金属イオンを取り込む能力に優れたグリシジル基を有するアクリル系モノマーが用いられる。上記アクリル系モノマーの中でも、特にグリシジルメタクリレート（GMA）は鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため特に好適に使用される。

- 10 また、上記グリシジル基を有するアクリル系モノマーとスチレン系モノマーとを併用することも好ましい。

- 上記親水基を有さないモノマーとして、グリシジル基を有するアクリル系モノマーとスチレン系モノマーとを併用する場合、上記有機高分子物質中のスチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率は5～90重量%であることが好ましい。
15 い。5重量%未満であると、得られる粒子の水中での分散安定性が低くなり、重合中に自己凝集し易くなり、また、90重量%を超えると、磁性体の前駆体である金属イオンとの親和性が低くなり、粒子内に形成する磁性体が少なくなる。

上記グリシジル基を有するアクリル系モノマーとスチレン系モノマーとを併用する際に、更に、メチルメタクリレートを併用してもよい。

- 20 また用途によっては、上記親水基を有さないモノマーとして架橋性モノマーが使用され、上記有機高分子物質が架橋されていてもよい。

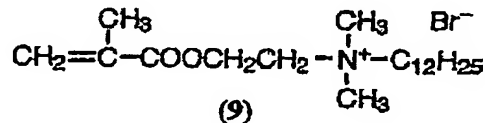
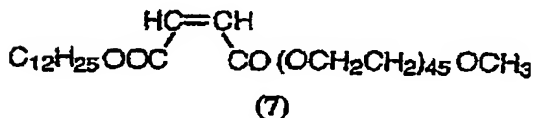
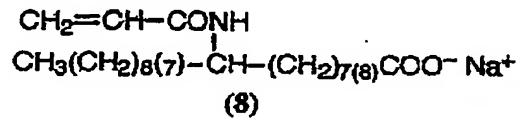
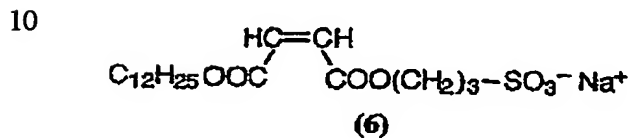
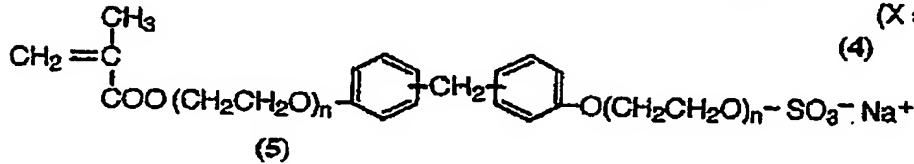
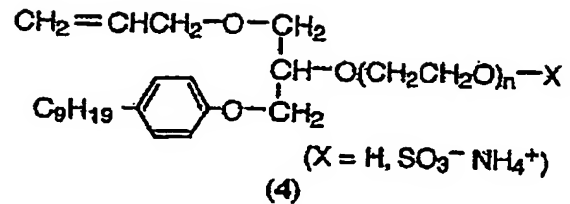
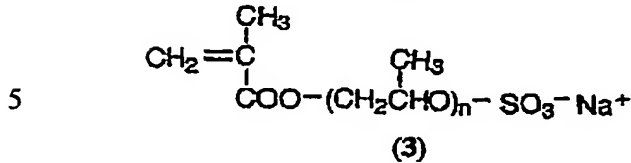
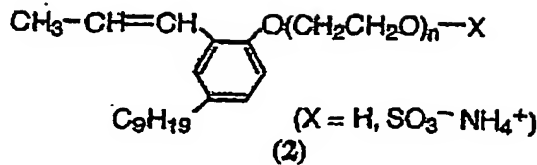
- 上記架橋性モノマーとしては、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルビフェニル、ジビニルナフタレン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、1, 6-ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパンテトラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。
- 25

これらの架橋性モノマーのなかでも、エチレングリコールジ（メタ）アクリレートは鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

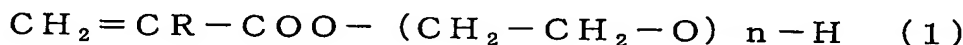
＜親水基を有するモノマー＞

- 上記親水基を有するモノマーとしては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、
- 5 イタコン酸、フマル酸、マレイン酸などの重合性不飽和結合を有するカルボン酸；重合性不飽和結合を有するリン酸エステル；重合性不飽和結合を有するスルホン酸エステル；ジメチルアミノエチルメタクリレート 4 級塩、ジエチルアミノエチルメタクリレート 4 級塩などのアクリロイル基を有するアミンの塩やビニルピリジンなどのビニル基を有する含窒素化合物の塩のようにカチオン基を有するビ
- 10 ニル系モノマー；2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、メチロールアクリルアミド、グリセロールメタクリレート（GLM）などの非イオン性ビニル系モノマー等の一般に親水性モノマーと称されているものの他、親水基を有する反応性乳化剤等が挙げられる。これら親水基を有するモノマーは、単独で用いてもよく、2 種以
- 15 上を併用しても良い。

上記親水基を有する反応性乳化剤としては、例えば、下記一般式（2）～（9）で表される反応性乳化剤類が挙げられる。



- 15 上記親水基を有するモノマーのなかでも、下記一般式（１）で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートや上記一般式（２）で表される反応性乳化剤は、水中で粒子を安定に分散する能力が高く、磁性体の生成を妨げないので好適に使用される。



- 20 式中、RはH又はCH₃を表し、nは1～20の整数を表す。

上記一般式（２）中、nは3～30の整数を表し、好ましくは5～20の整数を表す。

- 本発明の磁性体内包粒子は磁性体含有量のバラツキが小さいことが好ましい。磁性体内包粒子の磁性体含有量のバラツキを評価する方法としては、SEM-EDXを用いる方法、同期発光分析を利用する方法等が挙げられる。

上記SEM-EDXは、SEM観察を行っている微小領域のEDX分析（定性分析、定量分析、マッピング、粒子解析等）を行う装置であり、磁性体含有量のバラツキを測定することができる。

上記同期発光分析を利用する測定装置としては、例えば、パーティクルアナラ

イザー（DP-1000、堀場製作所社製）が市販されている。パーティクルアナライザーは、アスピレータによりサンプリングした固体微粒子に、ヘリウムマイクロ波誘導プラズマの高い励起エネルギーを照射して、固体微粒子1個ずつの同期発光を計測する仕組みで、固体微粒子の幅広い用途元素の分析、及び、様々な成分の混在状態を解析することが可能である。

磁性体内包粒子の磁性体含有量のバラツキは、有機高分子物質を構成する炭素元素と磁性体を構成する金属元素の同期発光を測定し、粒子毎の炭素元素と金属元素との混在比率のバラツキから算出したその測定データの分散状態を示す偏差値（絶対偏差）で比較評価することができる。上記偏差値は、その数値が小さいほど磁性体含有量のバラツキが小さく、即ち磁性体内包粒子の均一性が高く、大きいほど磁性体含有量のバラツキが大きい、即ち磁性体内包粒子の均一性が低いことを示している。

本発明の磁性体内包粒子は、有機高分子物質を構成する炭素元素と磁性体を構成する金属元素との構成比率の絶対偏差が0.3以下であることが好ましい。0.3を超えると、免疫測定法に利用した場合、測定再現性や定量性が低くなり測定精度が悪化し、得られる測定データの信頼性が低くなる。より好ましくは0.27以下であり、更に好ましくは0.25以下であり、更に好ましくは0.20以下である。

上記磁性体は、磁性体内包粒子を形成する重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成したものであるのが好ましい。

<金属イオン>

上記金属イオンは、磁性体を形成するものであれば特に限定されないが、好ましくは、鉄イオン、コバルトイオン、ニッケルイオン等であり、より好ましくは鉄イオンである。磁性体であるマグネタイトは塩化第2鉄を酸化剤等で酸化して得られる。重合開始剤により、上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化（マグネタイト化）を行うことにより磁性体（マグネタイト）内包粒子が調製される。

上記磁性体の平均粒径は1～30nmである。1nm未満であると、磁性体の磁性応答特性が減少し、即ち磁性体内包粒子の磁性応答特性が減少し、免疫測定

に使用した際の測定感度が低下する。また、30 nmを超えると、粒子内での分散性が低下する。好ましくは、2～20 nmであり、より好ましくは、2～10 nmである。

5 本発明の磁性体内包粒子において、上記磁性体は分散した状態で磁性体内包粒子内部に包含されている。即ち、本発明の磁性体内包粒子においては、磁性体が粒子表面に露出することなく、粒子内部に分散した状態で存在している。

10 本発明の磁性体内包粒子の磁性体含有量は、0.1～50重量%の範囲で調整するのが好ましい。0.1重量%未満であると、磁性体内包粒子の磁性応答特性が減少し、免疫測定に使用した際の測定感度が低下する。また、50重量%を超えると、粒子の重合操作性が低下し、粒子重合中に金属イオンを取り込み難くなる。より好ましくは0.1～40重量%であり、更に好ましくは1～30重量%である。

15 また、本発明の磁性体内包粒子は、必要に応じて、粒子表面にカルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基、スルホン酸基等の官能基を有していてもよい。これらの官能基を介して抗原や抗体と共有結合を行うことができる。

20 上記官能基は、各々の官能基を有するモノマーを重合用モノマー混合物に予め配合するか、又は、重合途中に添加することにより磁性体内包粒子の表面に導入することができる。上記官能基を有するモノマーとしては、例えば、カルボキシル基を有するモノマーとしては(メタ)アクリル酸等が挙げられ、水酸基を有するモノマーとしては2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート等が挙げられ、エポキシ基を有するモノマーとしてはグリシジル(メタ)アクリレート等が挙げられ、トリエチルアンモニウム基を有するモノマーとしてはトリエチルアンモニウム(メタ)アクリレート等が挙げられ、ジメチルアミノ基を有するモノマーとして
25 としてはジメチルアミノ(メタ)アクリレート等が挙げられる。

本発明の磁性体内包粒子は、必要に応じて粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合していてもよい。

<リンカー>

上記リンカーとは、磁性体内包粒子を免疫測定に使用した際、有機高分子物質

からなる粒子と抗原、抗体等の化合物との間に存在することになる化学物質である。上記リンカーは、立体障害が起こらないような長さで、かつ、非特異的吸着が生じにくい化合物であり、有機高分子物質からなる粒子及び抗原、抗体等の化合物と結合する前は、その分子末端に、例えば、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、トシル基、チオール基等の抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有していることが好ましい。本発明におけるリンカーとしては、粒子表面のグリシジル基含有モノマー由来のエポキシ基、又はエポキシ基の開環により生じる水酸基、アミノ基等と抗原、抗体等を適当な距離を置いて結合し得るものであれば特に限定されない。好ましくは、エポキシ基を複数末端に有する化合物、例えば、
5 ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル等が挙げられる。より好ましくは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルが挙げられる。

このようなリンカーを磁性体内包粒子の粒子表面に導入することにより、例えば、磁性体内包粒子に結合する抗原、抗体、試薬等の反応性を上げることが可能となり、即ち感度良く精密な測定が可能となり、また、磁性体内包粒子の粒子表面がタンパク質に対して非吸着性のものであっても、リンカーがタンパク質との結合性を有するので、抗原又は抗体を磁性体内包粒子に確実に結合させることが可能となる。

本発明の磁性体内包粒子の平均粒径は、その重合条件により $0.05 \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲で調整するのが好ましい。 $0.05 \mu\text{m}$ 未満であると、凝集しやすくなり、分散安定性が低下し、 $1 \mu\text{m}$ を超えると、例えば、磁性体内包粒子を懸濁液中で使用する場合は、磁性体内包粒子が沈殿し易くなり、また、免疫クロマト法のように磁性体内包粒子を多孔性担体中で使用する場合は、多孔性担体中で磁性体内包粒子が移動しにくくなるなど、試薬としての取り扱い性が低下する。より好ましくは、 $0.06 \sim 0.8 \mu\text{m}$ であり、更に好ましくは、 $0.07 \sim 0.5 \mu\text{m}$ である。

本発明の磁性体内包粒子は、水系溶媒中において上記親水基を有さないモノマー及び／又は上記親水基を有するモノマーを重合して粒子を形成する工程と、上

記粒子中に金属イオンを取り込みながら上記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、上記粒子を形成する工程と上記磁性体を形成する工程とを同時に進行させる方法により製造される。

- 水系溶媒中において親水基を有さないモノマー及び／又は親水基を有するモノマーを重合して粒子を形成する工程においては、重合開始剤が用いられる。

<重合開始剤>

上記重合開始剤としては特に限定されず、例えば、水溶性の有機アゾ化合物、無機過酸化物、有機過酸化物等が挙げられる。

- 上記重合開始剤の好適な例としては、過硫酸カリウム（以下「KPS」と記す；重合温度70℃）、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩（重合温度70℃）、2, 2-アゾビス〔2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン〕ジハイドロクロライド（重合温度60℃）、過硫酸アンモニウム（重合温度70℃）等が挙げられる。このうち過酸化物系重合開始剤であるKPSや過硫酸アンモニウムは、重合開始とともに2価の鉄イオンの酸化に寄与することが期待され、KPSや過硫酸アンモニウムを用いた場合は、モノマーと鉄イオンによる重合とマグネタイト生成とが同時に進行することが想定される。アゾビスアミジノプロパン塩酸塩及び2, 2-アゾビス〔2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン〕ジハイドロクロライドは酸化力が弱く、2価の鉄イオンの緩やかな酸化反応に関与する重合開始剤となる。なお、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩としては、商品名「V-50」（和光純薬工業社製）が、2, 2-アゾビス〔2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン〕ジハイドロクロライドとしては、商品名「VA-044」（和光純薬工業社製）が市販されている。

- 上記重合開始剤は、 Fe^{2+} の酸化により消費されたり、 Fe^{3+} によってラジカル活性を失う場合があるため、粒子成長を促す目的で、粒子成長過程に後添加することが有効である。この場合、新たな2次粒子は形成されず、粒子表面がポリマーで被覆される。

<pH調整剤>

本発明において、重合と同時に磁性体を作製するためには、重合系内のpHは塩基性に調整されるのが好ましい。上記重合開始剤としてKPSや過硫酸アンモ

ニウムを用いた系では、水中での分散安定性がよく粒径分布の狭い単分散粒子が得られるというメリットがあるが、酸化力の制御ができず重合系内が酸性になるために磁石への引き寄せられ方の弱い粒子になるというデメリットがある。一方、上記重合開始剤として酸化力を持たない2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドを用いた系では、重合系内のpHがほぼ中性であるというメリットがある。

重合系内のpHを弱塩基性に保つには、一般的な塩基を使用することができる。好ましくは NH_4OH がpH調整剤として使用される。

上記pH調整剤は、必要に応じて数回添加することができる。

10 <重合方法>

本発明の磁性体内包粒子は、懸濁重合、分散重合、乳化重合、ソープフリー乳化重合等の粒子重合法により製造できるが、最終的に得られる磁性体内包粒子のCv値は5%以下であることが好ましいので、粒径分布の制御に優れたソープフリー乳化重合により好適に製造される。

15 以下、ソープフリー乳化重合による磁性体内包粒子の作製方法を例示するが、この方法に限定されるものではない。

代表的な重合組成は、

親水基を有するモノマー及び親水基を有さないモノマーからなるモノマー組成物
: 3 g

20 H_2O : 100 g

からなる。四つ口フラスコに上記モノマー組成物及び水を秤量する。それぞれの口には攪拌棒、還流冷却管を取り付ける。次に、系を恒温槽に入れ、攪拌しながら系内を窒素置換する。恒温槽は、添加する重合開始剤の重合温度に調整するのが好ましく、例えば、重合開始剤としてKPS、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩又は過硫酸アンモニウムを用いる場合は70℃とするのが好ましく、重合開始剤として2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドを用いる場合は50~60℃とするのが好ましい。その後、水に溶かした重合開始剤を注射筒で系内に注入する。この時点を重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いて磁性源となる $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の水溶液を注入

する。 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は重合開始剤の1/3～4倍モルを水5gに溶かしたものを使用する。即ち、重合開始剤により上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化（マグネタイト化）を行うことにより粒子を製造する。

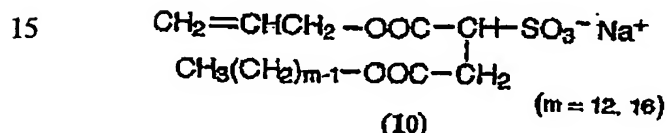
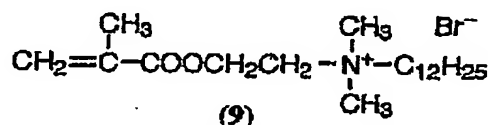
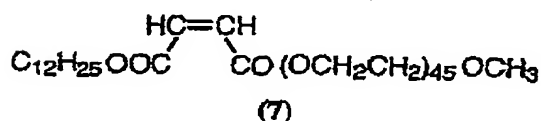
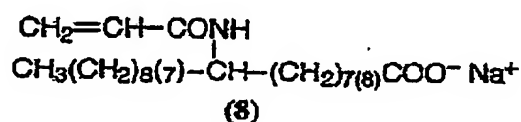
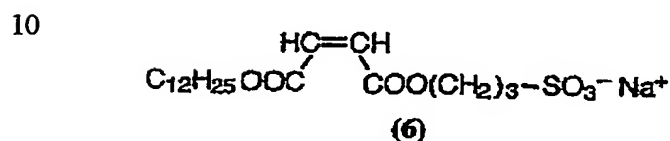
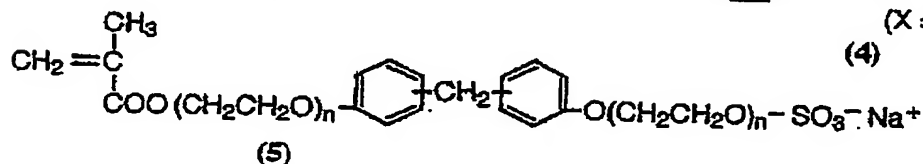
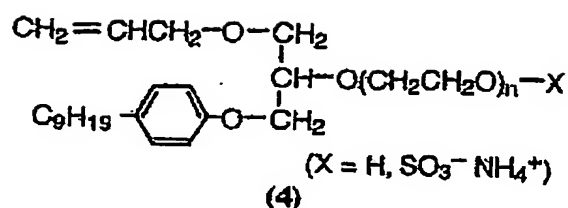
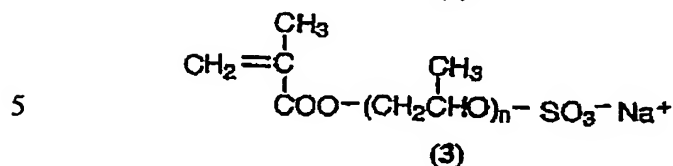
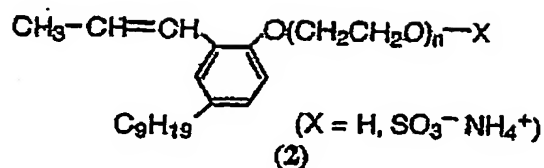
- 5 重合は開始から2時間～24時間行うことが好ましい。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH を加えてもよく、更に、重合による粒子の成長を促すために、重合途中に重合開始剤を加えてもよい。この様にして磁性体を分散状態で含有する有機高分子物質からなる粒子を得ることができる。

上記モノマー組成物には、共重合モノマーとして反応性乳化剤を添加してもよい。

10

<反応性乳化剤>

上記反応性乳化剤としては、例えば、下記一般式(2)～(10)で表される反応性乳化剤類が挙げられる。



これら反応性乳化剤は、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

- 20 作製した粒子は、残存モノマー、重合開始剤、未反応の鉄イオン等を取り除くために遠心分離・再分散を蒸留水で繰り返し行い精製する。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行う。精製後、得られた磁性体内包粒子は、ガラス製バイアルに移し、ふた・パラフィルムで密閉・保存する。

- 25 本発明の磁性体内包粒子の粒子表面へのリンカーの導入は、例えば、リンカー未導入の磁性体内包粒子をアルカリ性水溶液中に分散し、続いて、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル等のリンカーとなる化学物質を加えて、24時間程度混合することによりなし得る。

上述のようにして得られる本発明の磁性体内包粒子は、粒度分布が狭く、かつ、

磁性体含有量のバラツキが小さいため、極めて均質である。このため、本発明の磁性体内包粒子は分散安定性が高く取り扱い性に優れている。また、本発明の磁性体内包粒子は、平均粒径が比較的小さいためコロイド安定性がよい。また、本発明の磁性体内包粒子は、内包する磁性体が微小なサイズで分散して含有されているため、磁化された際にも残留磁気がなく、それに起因する自己凝集による沈降も生じない。

本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体を吸着又は結合させることにより免疫測定用粒子を得ることができる。抗体又は抗原を磁性体内包粒子に吸着又は結合させる方法としては、物理吸着法やカルボジイミドを用いた化学結合法等の公知の方法を使用することができる。本発明の磁性体内包粒子の粒子表面にエポキシ基を有するリンカーが導入されている場合は、リンカーを介して抗原又は抗体のアミノ基やチオール基等と化学結合させて、免疫測定用粒子を作製することができる。このような本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体が結合してなる免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

本発明の磁性体内包粒子や免疫測定用粒子は免疫測定法に用いることができる。本発明の磁性体内包粒子や免疫測定用粒子を用いる免疫測定法もまた、本発明の1つである。

本発明の免疫測定法としては、磁性体内包粒子を坦体として用いたラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ等の公知の方法が挙げられ、サンドイッチ法や競合法により、目的とする抗原又は抗体を測定することができる。また、上記方法の標識物質であるアイソトープ、酵素等の代わりに、磁性体内包粒子を標識として用いることができる。本発明の磁性体内包粒子は磁性体を均一に分散含有する粒径分布の狭い粒子であるため、免疫測定法において標識として用いることにより感度よく精密な測定を行うことができる。

本発明の磁性体内包粒子を標識として用いる免疫測定法の具体例としては、従来、蛍光物質、着色粒子、金属コロイド等が標識として利用されてきた免疫測定法が挙げられる。なかでも、近年、簡便かつ迅速に被検出物質を検出する手法としてよく利用されている免疫クロマト法が好適である。上記免疫クロマト法は、少なくとも2種類の抗体を利用したサンドイッチ法を利用している。上記サンド

イッチ法においては、一方の抗体は液相中で移動可能な状態で標識され、他方の抗体はクロマト担体に永久的に固定化されている。上記サンドイッチ法の試薬に試料を添加するとまず標識された抗体と被検出物質とが反応し、その後、標識抗体と被検出物質との複合体がクロマト担体中を移動し、クロマト担体に抗体が固定化された固定化部に来るとそこで固定化された抗体に補足される。通常、免疫クロマト法に用いられるクロマト担体は、ポアサイズが $5 \sim 20 \mu\text{m}$ であり、現在、一般的なサンドイッチ法は、標識として金属コロイドや着色粒子が用いられ、固定化部の着色（標識物の捕捉状態）を目視観察する定性検査として用いられている。

- 10 しかしながら、市販されている磁性体内包粒子は、クロマト担体中に滞留したり、展開させる側のクロマト先端部位付近に不均一に残留したりする等の問題点を有し、金属コロイドや着色粒子に比べクロマト展開性が大きく劣るため、免疫クロマト法への適性がない。

- 15 これに対して、本発明の磁性体内包粒子は、ポアサイズに比べ十分に小さな粒径であるため、毛細管現象でクロマト担体中を展開（移動）することができる。即ち、本発明の磁性体内包粒子は、平均的なポアサイズ（ $10 \sim 12 \mu\text{m}$ ）のクロマト担体に展開した場合、上述のような不均一な滞留が認められず、クロマト展開性が非常に優れている。これは、本発明の磁性体内包粒子は、1）粒度分布が狭く、2）磁性体含有量が均一であり、3）残留磁気による自己凝集が生じないため、と推察される。すなわち、本発明の磁性体内包粒子は、従来の磁性体内包粒子と異なり、免疫クロマト法への適性を有している。
- 20

発明を実施するための最良の形態

- 25 以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

（実施例 1 ～ 7）

200 mL の四つ口フラスコに表 1 に示す各種モノマー及び水 90 g を秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付

けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤であるKPS 0.06gを10gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、適度な酸化力を得るために、重合途中にNH₄OH水溶液(NH₄OH 0.165gを水5gに溶解)を加えた。また、重合開始から2分後に注射筒を用いてFeCl₂・4H₂O水溶液(FeCl₂・4H₂O 0.165gを水5gに溶解)を注入した。重合は重合開始から20時間行った。

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

表1

実施例	GMA	EGDM	AAm	PE-90	PE-350	NE-20	SE-20	FeCl ₂ ・4H ₂ O
1	2.835	0.015	0.15	—	—	—	—	0.088
2	2.835	0.015	—	0.15	—	—	—	0.176
3	2.685	0.015	—	0.3	—	—	—	0.176
4	2.835	0.015	—	—	0.15	—	—	0.176
5	2.685	0.015	—	—	0.3	—	—	0.176
6	2.835	0.015	0.05	—	—	0.15	—	0.088
7	2.835	0.015	0.15	—	—	—	0.06	0.176

(単位:g)

表中の記載は以下のとおりである。

GMA：グリシジルメタクリレート

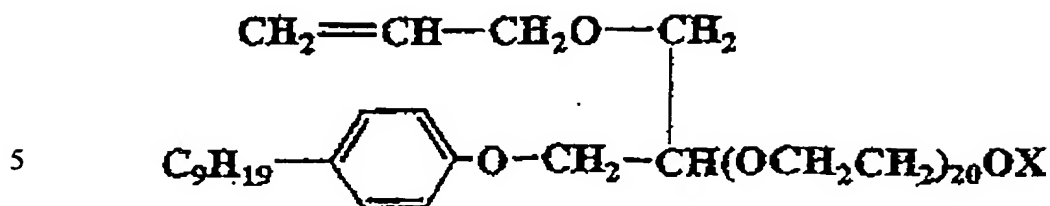
EGDM：エチレングリコールジメタクリレート

AAm：アクリルアミド

PE-90：ポリエチレングリコールメタクリレート (n=2)

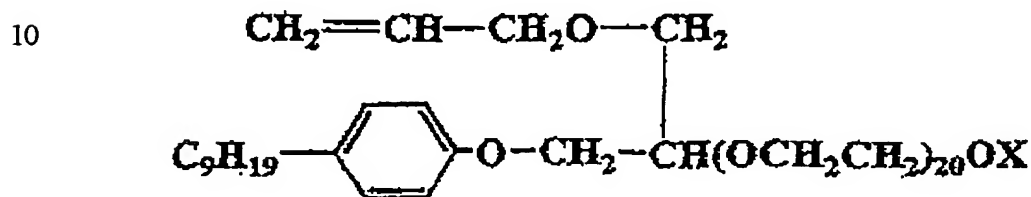
PE-350：ポリエチレングリコールメタクリレート (n=8)

NE-20:



式中、XはHを表す。

SE-20:



式中、Xは SO_4NH_4 を表す。

- 15 得られた磁性体内包粒子分散液について、目視で粒子の分散状態を観察した。また、精製した磁性体内包粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡（TEM）により、粒子の形態を観察した。

- 20 実施例1で得られた磁性体内包粒子は、一部凝集塊が認められ、時間が経つにつれて磁性体内包粒子が沈降する分散安定性のやや低いものであったため、超音波処理により再分散した。一方、親水基を有するモノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた実施例2～5、及び、反応性乳化剤を用いた実施例6、7は、いずれも凝集塊が認められず、分散安定性の高い磁性体内包粒子が得られた。特に、反応性乳化剤を用いた実施例6、7で得られた磁性体内包粒子は、粒子サイズが小さく、分散安定性が優れていることが認められた。また、
25 実施例1～7で得られた磁性体内包粒子は、いずれも磁性体内包粒子内部に磁性体を分散状態で含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。図1に実施例2の磁性体内包粒子のTEM写真（平均粒径；磁性体内包粒子 $0.21\mu\text{m}$ 、磁性体 5nm ）を示した。また、実施例1～7における磁性体内包粒子の磁

性体の平均粒径を表 2 に示した。

表 2

実施例	平均粒径(nm)
1	5
2	5
3	6
4	6
5	8
6	3
7	5

5

更に、実施例 1～7 で作製した磁性体内包粒子が、磁石へ引き寄せられることを確認するために、1. 5 mL のマイクロチューブに磁性体内包粒子の分散液を少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て (DYNAL 社製、MPC (登録商標) -M) にチューブを立てて、分散している磁性体内包
10 粒子が磁石に引き寄せられることを目視により確認した。特に、親水基を有するモノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた実施例 2～5 は、他の実施例 1、6、7 に比べ磁力が大きいことがうかがえた。

(実施例 8)

15 200 mL の四つ口フラスコに下記に示す各種モノマー及び水を秤量した。
GMA/E GDM/A A m/H₂O = 2. 835/0. 015/0. 15/90
(単位: g)

それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を 70℃ の恒温槽に入れ、200 r p m で攪拌しながら系内を 30 分間窒
20 素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤である KPS 0. 06 g を 10 g の水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、重合開始 1 分後に適度な酸化力を得るため NH₄OH 水溶液 (NH₄OH 0. 165 g を水 5 g に溶解) を加えた。また、重合開始から 2 分後に注射筒を用いて F e C
1₂・4 H₂O 水溶液 (F e C 1₂・4 H₂O 0. 165 g を水 5 g に溶解) を
25 注入した。重合は重合開始から 2 時間行った。

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返す行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

5

(実施例9)

重合開始後、下記物質の添加を以下の所定時間に変更したこと、重合時間を重合開始から3時間としたこと以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

10 NH_4OH 水溶液 (NH_4OH 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始30分後

KPS (KPS 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始60分後

(実施例10)

15 重合開始後、下記物質の添加を以下の所定時間に変更したこと、GMAをさらに後添加したこと、重合時間を重合開始から3時間としたこと以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

KPS (KPS 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始60分後

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始60分後

20 GMA 0.5g : 重合開始120分後 (尚、重合開始前には実施例8と同様に GMA 2.835gを四つ口フラスコに添加した)

NH_4OH 水溶液 (NH_4OH 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始120分後

25 (実施例11)

重合開始後、下記物質の添加を以下の所定時間に変更したこと、重合時間を重合開始から4時間としたこと以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

重合開始1分後 $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

NH_4OH 水溶液 (NH_4OH 0.165gを水5gに溶解) : 重合開始1

分後

KPS (KPS 0.165 g を水 5 g に溶解) : 重合開始 120 分後

実施例 8 ~ 11 で得られた磁性体内包粒子に対し、実施例 1 と同様にして TEM
5 M による磁性体内包粒子の形態観察を行なった。

実施例 9、10 は、いずれも、実施例 8 よりも多くの磁性体を含み、粒径が増大していることが認められた。また、実施例 11 では、内部に実施例 9、10 と同程度の磁性体を含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。

これまでの実験より、粒子成長の速い段階で NH_4OH を加えることは、成長
10 を阻害する要因になっていることが推測された。一方、重合開始剤の後添加は、重合率がほぼ 100 % になり、また、2 次粒子が形成されず粒子表面がポリマーで覆われていることが観察され、有効な手段であることが確認された。実施例 8 ~ 11 における磁性体内包粒子の磁性体の平均粒径を表 3 に示した。

15 表 3

実施例	平均粒径(nm)
8	8
9	8
10	10
11	8

(実施例 12)

実施例 2 で得られた磁性体内包粒子 1.0 g を 10 % アンモニア水 50 mL に
20 投入し、70 °C で 20 時間攪拌した。次いで、イオン交換水を用いて遠心洗浄を 3 回行い、50 mL のイオン交換水に分散させた。続いて、エチレングリコールジグリシジルエーテル 30 g を添加混合し、水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 11 に調整した後、室温で 24 時間攪拌した。反応後、イオン交換水を用いて遠心洗浄を 3 回行い、エポキシ基を有するリンカーが結合した磁性体内包粒子
25 を得た。

(実施例 13)

- 200 mLの四つ口フラスコにスチレン3.0 g、グリシジルメタクリレート3.0 g、エチレングリコールジメタクリレート0.03 g、ポリエチレングリコールメタクリレート0.3 g及び水200 gを秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200 rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、
- 5 水に溶かした重合開始剤であるKPS 0.1 gを20 gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、2分後に注射筒を用いて $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 gを水20 mLに溶解)を注入した。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH 0.4 gを加えた。
- 10 重合は重合開始から20時間行った。

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500 rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

15

(実施例14)

スチレン2.0 g、グリシジルメタクリレート4.0 gに変更したこと以外は実施例13と同様に磁性体内包粒子を作製した。

20 (実施例15)

スチレン4.0 g、グリシジルメタクリレート1.0 gに変更したこと以外は実施例13と同様に磁性体内包粒子を作製した。

(実施例16)

- 25 実施例13で作製した磁性体内包粒子1.0 gを10%アンモニア水50 mLに投入し、70℃で20時間攪拌した。次いで、イオン交換水を用いて遠心洗浄を3回行ない、50 mLのイオン交換水に分散させた。続いて、エチレングリコールジグリシジルエーテル30 gを添加混合し、水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを11に調整した後、室温で24時間攪拌した。反応後、イオン交換水を

用いて遠心洗浄を3回行ない、エポキシ基を有するリンカーが結合した磁性体内包粒子を得た。

(実施例17及び18)

- 5 2000mLの四つ口フラスコに表4に示す各種モノマー及び水800gを秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤である過硫酸アンモニウム0.2gを10gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時
- 10 とし、適度な酸化力を得るために、重合途中にNH₄OH水溶液(NH₄OH 0.5gを水10gに溶解)を加えた。また、重合開始から2分後に注射筒を用いてFeSO₄・7H₂O水溶液(FeSO₄・7H₂O 1.3gを水20gに溶解)を注入した。重合は重合開始から20時間行った。

- 作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。
- 15

表4

実施例	GMA	EGDM	St	MMA	HS-10
17	25.6	1.2	2.0	-	0.8
18	22.7	1.2	2.0	2.0	0.8

(単位:g)

表中の記載は以下のとおりである。

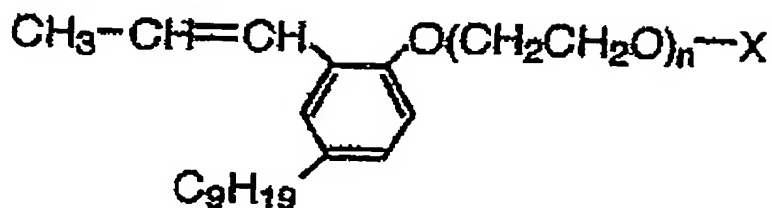
GMA：グリシジルメタクリレート

EGDM：エチレングリコールジメタクリレート

25 St：スチレン

MMA：メチルメタクリレート

HS-10 :



式中、Xは $\text{SO}_3^-\text{NH}_4^+$ を表し、nは10を表す。

(実施例19)

実施例17で得られた磁性体内包粒子1.0gを10%アンモニア水50mL
10 に投入し、70℃で20時間攪拌した。次いで、イオン交換水を用いて遠心洗浄
を3回行い、50mLのイオン交換水に分散させた。続いて、エチレングリコー
ルジグリシジルエーテル30gを添加混合し、水酸化ナトリウム水溶液を用いて
pHを11に調整した後、室温で24時間攪拌した。反応後、イオン交換水を用
いて遠心洗浄を3回行い、エポキシ基を有するリンカーが結合した磁性体内包粒
15 子を得た。

(実施例20)

実施例2で得られた磁性体内包粒子から免疫測定用粒子を作製した。

実施例2で得られた磁性体内包粒子30mgにリン酸緩衝液(100mmol
20 /L、pH7.5)6mLを加え、15000rpmにて20分間遠心分離を行
った。得られた沈渣に、抗HBsAgモノクローナル抗体を0.25mg/mL
の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/L、pH7.5)に溶解し
た溶液を1mL加え、室温にて20時間攪拌混和した。その後、未反応の抗HB
sAgモノクローナル抗体を除去するために15000rpmにて20分間遠心
25 分離を行い、更に、得られた沈渣をリン酸緩衝液(100mmol/L、pH7.
5)6mLに懸濁させ、再度15000rpmにて20分間遠心分離を行った。
その後、得られた沈渣を、牛血清アルブミンを1重量%の濃度になるようにリン
酸緩衝液(100mmol/L、pH7.5)に溶解した溶液6mLに懸濁させ、
室温で1時間攪拌してブロッキング処理を行い、抗HBsAgモノクローナル抗

体が磁性体内包粒子に結合された免疫測定用粒子を得た。

次に、得られた免疫測定用粒子を冷蔵保存するため、15000rpmにて20分間遠心分離を行い、得られた沈渣を、牛血清アルブミンの濃度が1重量%になるようにリン酸緩衝液(100mmol/L、pH7.5)に溶解し、更に、
5 アジ化ナトリウムを0.01重量%の濃度になるように溶解した溶液6mLに懸濁させ、すぐに冷蔵保存した。

(実施例21、22及び23)

実施例12、16及び19で得られたリンカーが結合した磁性体内包粒子から
10 免疫測定用粒子を作製した。

実施例12、16及び19で作製したリンカーが結合した磁性体内包粒子12mgに0.1Mホウ酸緩衝液1mLを加え、15000rpmにて10分間遠心分離を行い、上清を除去した。得られた沈渣に、0.1Mホウ酸バッファを380 μ L、抗 α -hCGモノクローナル抗体溶液(5.0mg/mL)を20 μ L
15 L加え、充分混和して、室温にて20時間攪拌した。反応液は15000rpmにて10分間遠心分離を行い、未反応の抗 α -hCGモノクローナル抗体を除去した。なお、磁性体内包粒子への抗 α -hCGモノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの55%であることを確認した。得られた沈渣は100mMリン酸緩衝液(pH7.5)1mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。
20 その沈渣を100mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを5%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液900 μ Lに懸濁させ、37 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後15000rpmにて20分間遠心分離を行い、沈渣に0.1Mホウ酸バッファ1mLを添加し、超音波で分散させた。続いて、100mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミン及
25 びグリセロールを各々5%(w/v)の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液1mLに懸濁させ、免疫測定用粒子を得た。

(比較例1～3)

比較例としてエスタポール M1-030/40（メルク社製）の3ロットを用いた。

（比較例4）

- 5 比較例1の磁性体内包粒子から免疫測定用粒子を作製した。

比較例1の磁性体内包粒子12.5mgにpH9.5の水酸化カリウム水溶液1mLを加え、15000rpmにて10分間遠心分離後、上清を除去し、分散液に添加されている界面活性剤を除去した。続いて、得られた沈渣に、0.02Mリン酸緩衝液625 μ L及び予め調整した2%濃度のカルボジイミド溶液（PBS緩衝液）0.625mLを添加し、37℃恒温槽中で1.5時間攪拌した。

10 反応溶液は、15000rpmにて10分間遠心分離を行い、上清を除去後、0.02Mリン酸緩衝液1.2mLを添加し、超音波で再分散した。前述の遠心洗浄操作を3回繰り返す、未反応のカルボジイミドを除去した。続いて、得られた沈渣に、0.1Mホウ酸緩衝液1.2mLを添加し、抗 α -hCGモノクローナル

15 抗体200 μ g加え、37℃恒温槽中で一晩攪拌した。翌日、反応溶液に30mMグリシン溶液（ホウ酸緩衝液）50 μ Lを添加し、37℃恒温槽中で30分間攪拌した。その後、15000rpmにて10分間遠心分離を行い、未反応の抗 α -hCGモノクローナル抗体を除去した。なお、磁性体内包粒子への抗 α -hCGモノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの63%であることを確認した。得られた沈渣は100mMリン酸緩衝液（pH6.5）1mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。得られた沈渣は、牛血清アルブミンが1%（w/v）濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液（pH6.5）1mLに懸濁させ、37℃恒温槽で30分間攪拌し、ブロッキング処理を行った。

20 その後、15000rpmにて10分間遠心分離を行い、その沈渣を牛血清アルブミン及びグリセロールを各々5%（w/v）、アジ化ナトリウムを0.01%（w/v）濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液（pH7.5）1mLに分散させ、免疫測定用粒子を得た。

<評価>

(1) 分散安定性の評価

実施例 13～18 で得られた磁性体内包粒子及び比較例 1～3 の磁性体内包粒子を用いて、固形分 1 % の分散液を調製し、超音波分散後、静置して沈降粒子の発生を目視で観察した。比較例 1～3 の磁性体内包粒子を用いた場合は分散直後に一部の沈降が認められた。また、静置した翌日にはサンプル瓶の底面に沈降層が形成され、分散安定性が悪いことがわかった。一方、実施例 13～18 の磁性体内包粒子では、静置した翌日においても沈降物は認められず、分散安定性が優れていることが明らかとなった。

(2) 粒子形状の評価

実施例 13～18 で得られた磁性体内包粒子及び比較例 1～3 の磁性体内包粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、粒子の形態を観察した。

TEM で観察された磁性体内包粒子と磁性体の平均粒径を表 5 に示した。

表 5

	平均粒径 (nm)	
	磁性体内包粒子	磁性体
実施例 13	230	5
実施例 14	190	6
実施例 15	320	4
実施例 16	230	5
実施例 17	115	6
実施例 18	100	8
比較例 1	370	20
比較例 2	410	21
比較例 3	520	24

表 5 より、実施例 13、14、15 及び 16 で得られた磁性体内包粒子は、いずれも均一粒径の球形粒子で、磁性体を内包していることが観察された。一方、比較例 1～3 ではいずれも粒径が 100～1000 μm の磁性体内包粒子が混ざっていて不均一であった。また、比較例 1～3 ではいずれも磁性体内包粒子表面に磁性体が露出しているのが確認された。

更に、作製した磁性体内包粒子 (実施例 13、14、15 及び 16) が、磁石

へ引き寄せられることを確認するために、1. 5 mLのマイクロチューブに磁性体内包粒子の分散液を少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て（DYNAL社製、MPC（登録商標）-M）にチューブを立てて、分散している磁性体内包粒子が磁石に引き寄せられることを視覚により確認した。

5

（３）磁性体含有量のバラツキの評価

パーティクルアナライザー（DP-1000 堀場製作所社製）を用いて、実施例15～18及び比較例1～3の磁性体内包粒子について、有機高分子物質を構成する炭素元素と磁性体を構成する鉄元素の同期発光を測定し、その測定データ

10 の偏差値を算出した。結果は表6に示した。

表 6

試料		偏差値
実施例	15	0.1160
	16	0.1198
	17	0.2504
	18	0.2417
比較例	1	0.3451
	2	0.2843
	3	0.3988

15 実施例及び比較例の磁性体内包粒子の偏差値を比較すると、実施例15～18の磁性体内包粒子の偏差値は小さく、磁性体含有量のバラツキが小さいことが分かる。一方、比較例1～3の磁性体内包粒子は、偏差値が大きく、磁性体含有量のバラツキが大きいことが明らかとなった。

20 （４）クロマト展開性の評価 1

（４）－１ クロマト展開性の確認

実施例21、22及び比較例4の免疫測定用粒子を固形分0.045%（w/v）になるように、牛血清アルブミン1%（w/v）及びトリトン-100 0.03%（w/v）濃度になるように調整した生理食塩水に分散した。各々の分散

25 液30 μ Lをポアサイズ10～12 μ mのニトロセルロースメンブレン（SRH

F P 7 0、日本ミリポア社製) にスポットし、円形状に分散液を展開させた。展開した分散液は、いずれも直径約 18 mm の円状であった。その後、乾燥させ、磁性体内包粒子の展開により着色された円形の直径を計測した。結果は、実施例 18 の免疫測定用粒子を用いた場合で 16 mm であり、実施例 19 の免疫測定用
5 粒子を用いた場合で 17 mm であり、比較例 4 の免疫測定用粒子を用いた場合で 12 mm であった。

実施例 21、22 においては、免疫測定用粒子の展開域が媒体の展開域の約 92% であったことから、クロマト担体中を展開媒体と共にスムーズに展開していることが分かった。一方、比較例 4 では、上記展開域が、約 70% であることから実施例 21、22 に比べると展開性に劣る。また、比較例 4 では、スポット中心部付近の着色が濃く不均一な展開であることが分かった。
10

(4) - 2 試験片の作製

ニトロセルロースメンブレン (SRHF P 7 0、日本ミリポア社製) を幅 20 cm × 長さ 6 cm に裁断し、その長さ方向上端より 3 cm の部位 (反応部位)
15 に、抗 β -hCG モノクローナル抗体を 2.0 mg/ml の濃度になるようにトリス塩酸緩衝液 (10 mmol/L、pH 7.4) に溶解した溶液を幅 0.7 mm の直線状に塗布した。その後、37℃ で 2 時間乾燥した後、牛血清アルブミン (和光純薬工業社製) を 1 重量% の濃度になるようにリン酸緩衝液 (100 mmol/L、pH 7.5) に溶解した溶液に 1 時間浸漬し、ブロッキング処理を行
20 った。更にその後、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを 0.1 重量% の濃度になるようにリン酸緩衝液 (100 mmol/L、pH 7.5) に溶解した溶液に洗浄後、シリカゲルデシケーター内で室温下にて乾燥し、抗 β -hCG モノクローナル抗体を固定化した試験片を得た。

25 得られた試験片を幅 5 mm に裁断し、長さ方向上端に幅 5 mm × 長さ 20 mm の吸水パッド (AP 22 日本ミリポア社製) を、下端に幅 5 mm × 長さ 15 mm のコンジュゲートパッド (グラスファイバー 日本ミリポア社製) を重ね、透明なテープで固定して試験片とした。

(4) - 3 免疫測定の実施

実施例 2 1 ~ 2 3 及び比較例 4 の免疫測定用粒子を 0. 0 5 % (w / v) の濃度になるように、牛血清アルブミン 1 % (w / v)、 トリトン-1 0 0 0. 0 3 % (w / v) 及び h C G が 0 m I U / m L、2 5 m I U / m L、1 0 0 m I U / m L、1 0 0 0 m I U / m L 及び 5 0 0 0 m I U / m L 濃度になるように試験液を調整した生理食塩水に分散した。

次に、作製した試験片のコンジュゲートパッドに h C G が所定濃度の試験液 1 0 0 μ L をそれぞれ滴下した。

滴下 1.0 分後、実施例 2 1 ~ 2 3 の免疫測定用粒子を用いた場合は、h C G が 0 m I U / m L を除いた試験片は、反応部位において免疫測定用粒子に基づく着色が認められた。また、その着色度合いは、h C G 濃度に依存していることが確認された。また、反応部位において h C G 濃度に応じた磁性が確認され、磁性を標識とする免疫測定法に有用であることが示された。

一方、比較例 4 の免疫測定用粒子を用いた場合は、いずれの試験片も反応部位及び反応部位までの部位で免疫測定用粒子に基づく着色が認められた。特に、コンジュゲートパッドを重ねた部位付近の着色が強く、免疫測定用粒子が滞留していることが認められ、h C G が 1 0 0 0 m I U / m L 以上では、その部位は反応部位よりも強く着色していることが認められた。比較例 4 の免疫測定用粒子を用いた場合は、1) 試験片に免疫測定用粒子が滞留する、2) 被検出物質濃度に応じて展開する免疫測定用粒子量の変動する、3) 被検出物質が存在しなくても (h C G : 0 m I U / m L) 非特異的に反応部位に免疫測定用粒子がキャプチャーされることから、磁性を標識とする免疫測定法には適用できないことが示された。

(5) クロマト展開性の評価 2

25 (5) - 1 試験片の作製

ニトロセルロースメンブレン (S R H F、日本ミリポア社製) を幅 3 0 c m × 長さ 6 c m に裁断し、その長さ方向上端より 3 c m の部位 (反応部位) に、実施例 2 0 の免疫測定用粒子で用いたものとは異なる反応エピトープを有する抗 H B s A g モノクローナル抗体を 2. 0 m g / m L の濃度になるようにトリス塩酸緩

衝液（10 mmol/L、pH 7.4）に溶解した溶液を幅0.7 mmの直線状に塗布した。その後、37℃で2時間乾燥した後、牛血清アルブミン（和光純薬社製）を1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液（100 mmol/L、pH 7.5）に溶解した溶液に1時間浸漬し、ブロッッキング処理を行った。更にその後、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを0.1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液（100 mmol/L、pH 7.5）に溶解した溶液にて洗浄後、シリカゲルデシケーター内で室温下にて乾燥し、抗HBs Agモノクローナル抗体固定化膜を得た。

得られた抗HBs Agモノクローナル抗体固定化膜を幅5 mmに裁断し、長さ方向上端に幅5 mm×長さ2 cmの吸水用ろ紙（日本ミリポア社製）を重ね、透明なテープで固定して試験片とした。

（５）－２ 免疫測定の実施

リン酸緩衝液（100 mmol/L、pH 7.5）に実施例20の免疫測定用粒子を0.1重量%の濃度になるように溶解し、更に牛血清アルブミンを1重量%の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01重量%の濃度になるように溶解した溶液を作製し、該溶液20 µLを96ウェルマイクロプレート（ナルジェヌンクインターナショナル社製）の各ウェルに添加した。

次に、HBs抗原標準品（50 IU/mL）を所定の濃度になるようにリン酸緩衝液（100 mmol/L、pH 7.5）で希釈し、各々100 µLをウェルに添加混合後、試験片をウェル内に入れ、立位するように立てた。

30分後、試験片を取り出した所、反応部位においてHBs抗原濃度に応じた磁性が確認され、実施例20の免疫測定用粒子は磁性を標識とする免疫測定法に有用であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、親水基を有さないモノマーと親水基を有するモノマーとを重合して粒子を形成する反応と、粒子内に金属イオンを取り込ませながら金属イオンを変性して磁性体を形成する反応とを同時に行うことにより、均一な磁性を

- 有し、かつ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子を得ることができる。本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体を吸着又は結合させることにより本発明の免疫測定用粒子を得ることができる。また、本発明の磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いて免疫測定法を行うことにより、感度良く精密な測定が可能になる。更に、
- 5 本発明の磁性体内包粒子を標識として免疫測定法を行うことにより、感度よく精密な測定が可能になる。

- また、本発明の磁性体内包粒子にリンカーが導入されている場合には、例えば、磁性体内包粒子に結合する抗原、抗体、試薬等の反応性を上げることが可能となり、即ち感度良く精密な測定が可能となり、本発明の磁性体内包粒子の粒子表面
- 10 がタンパク質に対して非吸着性のものであっても、リンカーがタンパク質との結合性を有するので、抗原又は抗体を磁性体内包粒子に確実に結合させることが可能となる。

請求の範囲

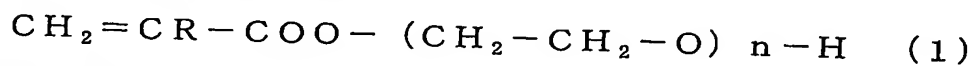
1. 有機高分子物質と平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、
- 5 前記磁性体は、分散した状態で粒子内部に包含されていることを特徴とする磁性体内包粒子。
2. 有機高分子物質を構成する炭素元素と磁性体を構成する金属元素との構成比率の絶対偏差が 0.3 以下であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の磁性
- 10 体内包粒子。
3. 磁性体は、磁性体内包粒子を形成する重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1 又は 2 項記載の磁性体内包粒子。
- 15 4. 金属イオンは、鉄イオンであることを特徴とする請求の範囲第 3 項記載の磁性体内包粒子。
5. 有機高分子物質は、アクリル系モノマーからなる重合体を主構成成分とする
- 20 ことを特徴とする請求の範囲第 1、2、3 又は 4 項記載の磁性体内包粒子。
6. アクリル系モノマーは、グリシジル基を有するモノマーであることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載の磁性体内包粒子。
- 25 7. 有機高分子物質は、グリシジル基を有するモノマーとスチレン系モノマーとからなる重合体を主構成成分とすることを特徴とする請求の範囲第 1、2、3 又は 4 項記載の磁性体内包粒子。
8. 有機高分子物質中のスチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率が、

5～90重量%であることを特徴とする請求の範囲第7項記載の磁性体内包粒子。

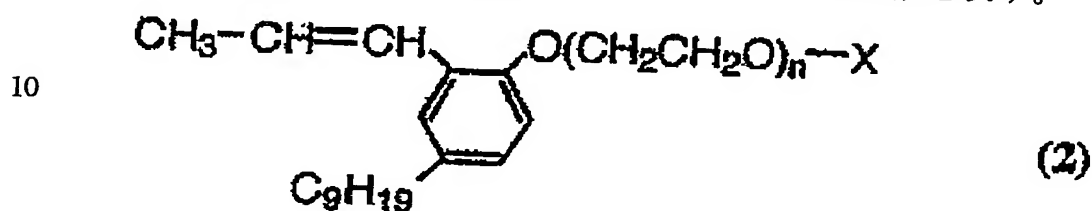
9. 有機高分子物質を構成する重合体のモノマー成分として、更に、下記一般式

(1) で表されるポリエチレングリコール(メタ)アクリレート又は下記一般式

5 (2) で表される化合物を有することを特徴とする請求の範囲第5、6、7又は8項記載の磁性体内包粒子。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは1～20の整数を表す。



式中、XはH又はSO₃⁻NH₄⁺を表し、nは3～30の整数を表す。

15 10. 有機高分子物質は、架橋されていることを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8又は9項記載の磁性体内包粒子。

11. 粒子表面に、カルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基からなる群より選ばれる

20 少なくとも1種の官能基を有することを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10項記載の磁性体内包粒子。

12. 平均粒径が0.05～1μmであることを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11項記載の磁性体内包粒子。

25

13. 磁性体の含有量が0.1～50重量%であることを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12項記載の磁性体内包粒子。

14. 磁性体の平均粒径が2～10nmであることを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13項記載の磁性体内包粒子。

5 15. 粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合していることを特徴とする請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14項記載の磁性体内包粒子。

16. 抗原又は抗体と共有結合可能な官能基は、エポキシ基であることを特徴とする請求の範囲第15項記載の磁性体内包粒子。

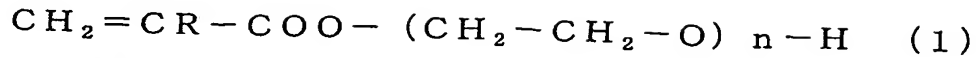
17. リンカーは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルであることを特徴とする請求の範囲第15又は16項記載の磁性体内包粒子。

15 18. 水系溶媒中において親水基を有さないモノマー及び／又は親水基を有するモノマーを重合して粒子を形成する工程と、
前記粒子中に金属イオンを取り込みながら前記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、
前記粒子を形成する工程と前記磁性体を形成する工程とを同時に進行させることを特徴とする磁性体内包粒子の製造方法。

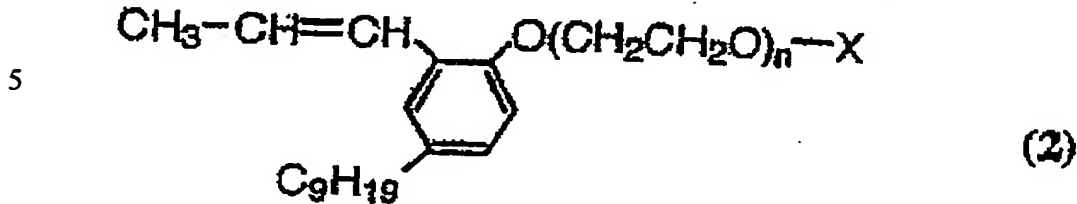
19. 親水基を有さないモノマーは、グリシジル基を有するアクリル系モノマー、又は、グリシジル基を有するアクリル系モノマー及びスチレン系モノマーであることを特徴とする請求の範囲第18項記載の磁性体内包粒子の製造方法。

20. 粒子を形成するモノマーは、親水基を有さないモノマー及び親水基を有するモノマーからなり、親水基を有するモノマーは、下記一般式(1)で表されるポリエチレングリコール(メタ)アクリレート又は下記一般式(2)で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲第18又は19項記載の磁性体内包粒

子の製造方法。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは1～2.0の整数を表す。



式中、XはH又はSO₃⁻NH₄⁺を表し、nは3～30の整数を表す。

10 21. 粒子を形成する工程において、共重合モノマーとして反応性乳化剤を添加することを特徴とする請求の範囲第18、19又は20項記載の磁性体内包粒子の製造方法。

15 22. 粒子を形成する工程において、重合開始剤を後添加することを特徴とする請求の範囲第18、19、20又は21項記載の磁性体内包粒子の製造方法。

23. 請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17項記載の磁性体内包粒子に、抗原又は抗体が吸着又は結合してなることを特徴とする免疫測定用粒子。

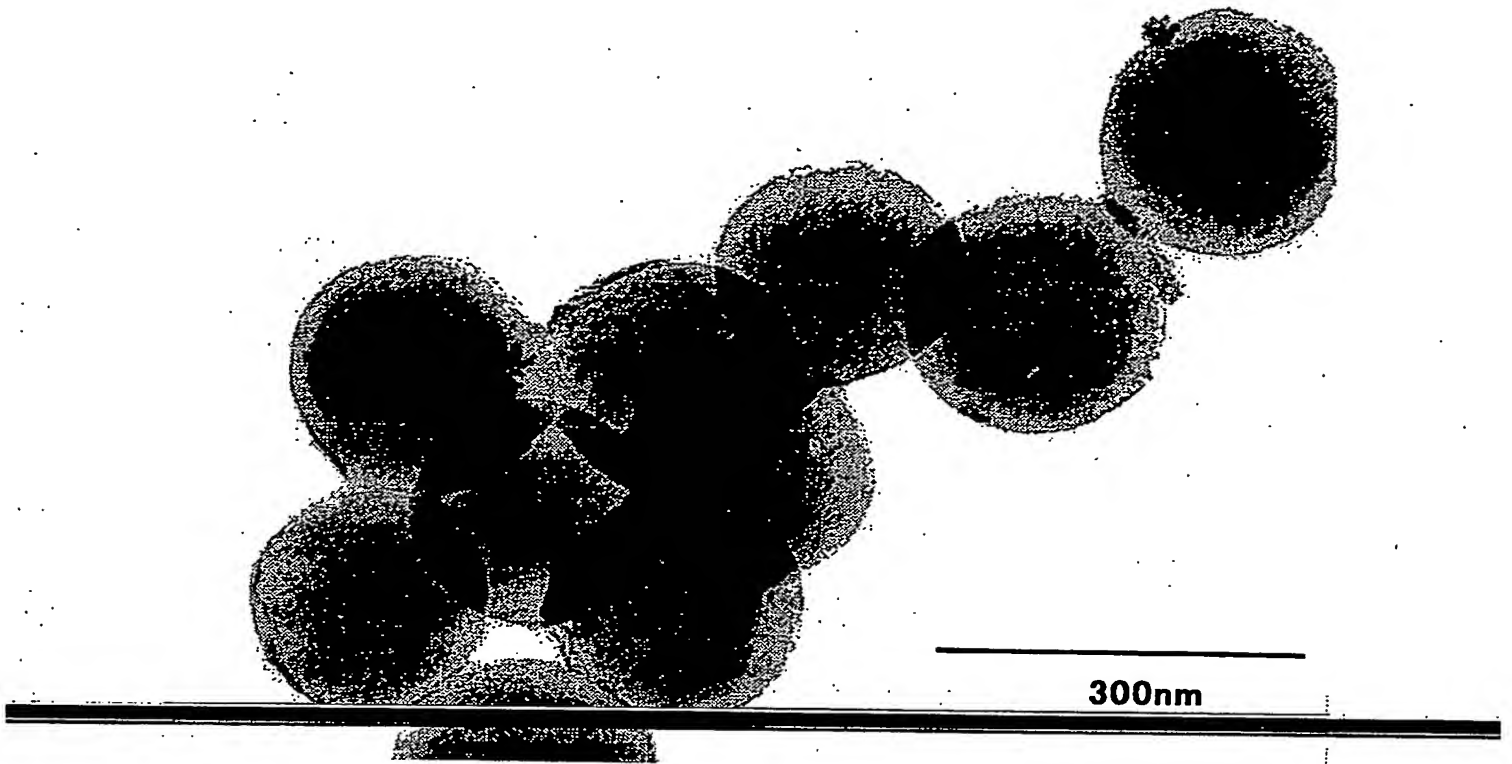
20 24. 請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17項記載の磁性体内包粒子又は請求の範囲第23項記載の免疫測定用粒子を用いることを特徴とする免疫測定法。

25 25. 請求の範囲第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17項記載の磁性体内包粒子を標識として用いることを特徴とする免疫測定法。

26. 免疫クロマト法を用いることを特徴とする請求の範囲第24又は25項記

載の免疫測定法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/553

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/553

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 9-208788 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 12 August, 1997 (12.08.97), Claims 1, 3; Par. Nos. [0030], [0032], [0035], [0049], [0050], [0065] to [0070]; table 1 & US 5814687 A	1-25 26
Y A	JP 2003-14764 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 15 January, 2003 (15.01.03), Claims 1, 11; Par. No. [0060] & EP 1253427 A & US 2002/177234 A	26 1-25
E, X	JP 2004-163421 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 10 June, 2004 (10.06.04), Claims 1 to 4 (Family: none)	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 June, 2004 (30.06.04)

Date of mailing of the international search report
20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-231957 A (Nippon Paint Co., Ltd.), 07 April, 1994 (07.04.94), & EP 0420186 A & US 5320944 A	1-26
A	JP 2002-196001 A (Shino-Test Corp.), 10 July, 2002 (10.07.02), (Family: none)	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/553

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/553

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-208788 A (日本合成ゴム株式会社) 1997. 08. 12 請求項1、請求項3、【0030】、【0032】、【0035】、【0049】、【0050】、【0065】～【0070】、表1	1-25
Y	& US 5814687 A	26

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 06. 2004

国際調査報告の発送日

20. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP 2003-14764 A (松下電器産業株式会社) 2003. 01. 15 請求項1、請求項11、【0060】 & EP 1253427 A & US 2002/177234 A	26 1-25
EX	JP 2004-163421 A (積水化学工業株式会社) 2004. 06. 10 請求項1-14 (ファミリーなし)	1-26
A	JP 6-231957 A (日本ペイント株式会社) 1994. 04. 07 & EP 0420186 A & US 5320944 A	1-26
A	JP 2002-196001 A (株式会社シノテスト) 2002. 07. 10 (ファミリーなし)	1-26